

## СОСТОЯНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ГНОЙНЫМ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНЫМ СИНУСИТОМ

*Е.В. Огнивенко<sup>1</sup>, Н.Н. Попов<sup>1</sup>, Е.А. Романова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина

<sup>2</sup>Государственное учреждение «Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины», Харьков

### РЕЗЮМЕ

Состояние антимикробного иммунитета было изучено у 26 больных хроническим гнойным верхнечелюстным синуситом в фазе обострения при сопутствующем инсулинзависимом сахарном диабете (1 группа) и 28 больных хроническим гнойным верхнечелюстным синуситом, не страдающих эндокринопатиями – 2 группа. Развитие гнойного верхнечелюстного синусита у лиц с ИЗСД протекает на фоне снижения активности основных противомикробных факторов иммунитета, аффинности продуцируемых антител, опсонизирующих свойств сыворотки, фагоцитарной и биоцидной активности нейтрофилов.

Снижение биоцидности нейтрофилов ассоциируется с нарушениями как кислородзависимых, так и кислороднезависимых антимикробных механизмов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** антимикробный иммунитет, нейтрофилы

В возникновении и развитии хронических риносинуситов наряду с особенностями возбудителя, его патогенными, вирулентными и инвазивными свойствами большую роль играют иммунные нарушения как системного, так и местного характера, расстройства во взаимодействии различных звеньев иммунной системы [1, 3].

Известно, что ведущую роль в элиминации инфекционных агентов из организма играют клетки с фагоцитарными свойствами. Фагоциты поглощают и переваривают микробы. Антитела и комплемент выступают в качестве опсонов, способствуя этому процессу. Комплемент также обладает прямым механизмом лизиса микробных клеток.

Учитывая, что разработка оптимального алгоритма терапии невозможно без учета характера изменений в иммунореактивности организма, целью настоящей работы явилось изучение активности факторов антимикробного иммунитета у больных хроническим гнойным верхнечелюстным синуситом (ХГВС), страдающих инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД).

Исследования выполнены в рамках научно-исследовательской работы «Разработка эффективных технологий реабилитации иммунной системы детей и взрослых, страдающих инфекционно-воспалительными заболеваниями ЛОР-органов», № госрегистрации 015U002857.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Состояние антимикробного иммунитета было изучено у 29 больных хроническим гнойным верхнечелюстным синуситом в фазе обострения при сопутствующем ИЗСД

– 1 группа (основная) и 29 больных хроническим гнойным верхнечелюстным синуситом, не страдающих эндокринопатиями – 2 группа (сравнения). Возраст больных составил от 18 до 50 лет. Степень тяжести ИЗСД определялась как среднетяжелая. Контрольная группа была сформирована из 30 здоровых лиц.

Все больные проходили комплекс общеклинических исследований.

Программа иммунологических исследований включала определение фагоцитарной активности нейтрофилов, эффективности внутриклеточного киллинга бактерий, состояния микробицидных систем клеток, опсонизирующих свойств сыворотки, титра антител к этиологическим инфекционным возбудителям, аффинности вырабатываемых антител, содержания основных классов иммуноглобулинов и комплемента в сыворотке крови.

Нейтрофилы из периферической крови выделяли на градиенте двойной плотности фиколла-верографина (1,093:1,077).

Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по их способности поглощать бактерии *S. aureus* (штамма 209). Для этого смешивали 1 мл суспензии нейтрофилов ( $10^7$  клеток) и 1 мл взвеси бактерий ( $10^9$ ) в растворе Хенкса. Смесь инкубировали 30 мин при температуре 37°C при постоянном помешивании. По окончании процедуры на стеклах готовили мазки, которые окрашивали по Романовскому-Гимзе. Определяли фагоцитарное число (ФЧ – число фагоцитирующих клеток) и фагоцитарный индекс (ФИ – число бактерий, поглощенных одной клеткой). Эффективность фагоцитоза опсонизированных бактерий изучали

аналогичным способом. Опсонизацию бактерий проводили в растворе Хенкса, содержащем 20% термоинактивированной сыворотки больных (аутосыворотки) или сыворотки здоровых доноров (пул от 5 доноров) в течение 30 мин при 37°C.

Эффективность внутриклеточного киллинга (БК) оценивали по методу S.Nielsen [10]. Число поглощенных, но живых стафилококков определяли по высеву лизата лейкоцитов по методу Гольда на чашки Петри с мясопептонным агаром. Лизис лейкоцитов вызывали путем добавления 3-кратного объема воды.

Кислородзависимую метаболическую активность фагоцитов изучали в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте, результаты учитывали морфологически и выражали в процентах формазанположительных клеток. В качестве стимулятора использовали взвесь убитых бактерий *S.aureus* (штамм 209) в дозе  $10^9$ /мл.

Активность миелопероксидазы (МПО) и катионных белков (КБ) в нейтрофилах оценивали цитохимически (Э. Пирс, 1962; В.Е. Пигачевский и соавт., 1981). Об активности МПО и катионных белков судили по среднему цитохимическому коэффициенту (СЦК), которые вычисляли в соответствии с рекомендациями авторов.

Титр антител к этиологическим инфекционным возбудителям и общей антигенной детерминанте (ОАД) бактерий определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) [5]. Оптическую плотность (ОП) исследуемых образцов учитывали на аппарате «Star Fax 303 Plus». Ставили два контроля: контроль сыворотки (лунки не сенсibilизировали антигеном) и контроль антител (в лунки не вносили сыворотку). В качестве отрицательного стандарта использовали пул сывороток 10 здоровых доноров. Титр антител выражали в относительных единицах (ОЕ), вычисляя по формуле  $ОЕ = \frac{ОП_{450-630} \text{ сыворотки больного}}{ОП_{450-630} \text{ здоровых лиц}}$ .

В качестве бактериальных антигенов

использовали ультразвуковые дезинтегранты, приготовленные из односуточной культуры микробных тел, убитых нагреванием в течение 2 часов на кипящей водяной бане [7].

Аффинность антител (IgG) оценивали с помощью относительной величины по методике R. Luxton и E. Tompson [9], Я.И. Тельнюк с соавт. [4]. Значения аффинности вычисляли по формуле и выражали в относительных единицах (ОЕ):

$$ОЕ = A_5 \times 12 + A_{4,5} \times 11 + A_4 \times 10 + A_{3,5} \times 9,$$

где  $A_5$ ,  $A_{4,5}$ ,  $A_4$ ,  $A_{3,5}$  - относительное содержание антител, оставшихся в лунках планшета после внесения раствора тиоцианата натрия соответствующей концентрации по отношению к исходному уровню антител.

Концентрацию иммуноглобулинов определяли спектрофотометрическим методом [8].

Активность комплемента оценивали по 50% гемолизу [6].

Активность лизоцима в клетках определяли турбодиметрически [2].

Математическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Определяли среднее арифметическое значение  $M$  и его среднеквадратичное отклонение  $\sigma$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Проведенные исследования показали, что у лиц при сопутствующем ИЗСД обострение ХГВС протекает на фоне повышения концентрации IgG и активности комплемента и сниженных значений IgA. Подобная тенденция прослеживается и у больных группы сравнения, однако в меньшей степени выраженности (табл. 1).

Таблица 1  
Содержание иммуноглобулинов и комплемента в сыворотке крови больных ХГВС ( $M \pm \sigma$ )

| Показатели      | Здоровые лица | Больные ХГВС+ИЗСД | Больные ХГВС без ИЗСД |
|-----------------|---------------|-------------------|-----------------------|
| IgA г/л         | 1,7±0,16      | 1,4±0,17          | 1,5±0,16              |
| IgM г/л         | 1,8±0,16      | 1,6±0,19          | 1,7±0,18              |
| IgG г/л         | 12,6±1,14     | 15,2±1,17         | 13,2±1,14             |
| Комплемент, у.е | 1,4±0,12      | 2,1±0,21*         | 1,7±0,16              |

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с показателями здоровых лиц

У всех обследованных больных основной группы и группы сравнения обнаружилось достоверное повышение титра антител к бактериальным этиологическим факторам. Высокие титры антител были выявлены

практически ко всем изученным микробам (табл. 2). Однако более высокий их уровень определялся у лиц не страдающих ИЗСД.

В сыворотке больных также определялось повышение титра антител к общей

антигенной детерминате (ОАД) бактерий.

Дальнейшие исследования показали, что вырабатываемые антитела у больных хроническим верхнечелюстным синуситом

при сопутствующем ИЗСД проявляют сниженную аффинность, по сравнению со здоровыми лицами и больными ХГВС без ИЗСД (табл. 3).

Таблица 2

**Содержание антител (ОЕ) к инфекционным возбудителям в сыворотке крови больных ХГВС ( $M \pm \sigma$ )**

| Микробы               | Больные ХГВС+ИЗСД | Больные ХГВС без ИЗСД |
|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| <i>S. pneumoniae</i>  | 1,7 $\pm$ 0,2     | 1,9 $\pm$ 0,2         |
| <i>M. catarrhalis</i> | 1,7 $\pm$ 0,2     | 1,9 $\pm$ 0,2         |
| <i>H. influenza</i>   | 1,6 $\pm$ 0,2     | 1,8 $\pm$ 0,2         |
| <i>S. aureus</i>      | 1,6 $\pm$ 0,2     | 1,8 $\pm$ 0,2         |
| <i>S. pyogenes</i>    | 1,6 $\pm$ 0,2     | 1,8 $\pm$ 0,2         |
| ОАД бактерий          | 1,6 $\pm$ 0,2     | 1,8 $\pm$ 0,2         |

Таблица 3

**Аффинность антител (у.е) к ОАД микробов больных ХГВС ( $M \pm \sigma$ )**

| Здоровые лица | Больные ХГВС+ИЗСД            | Больные ХГВС без ИЗСД |
|---------------|------------------------------|-----------------------|
| > 1000        | 417 $\pm$ 92,7 <sup>**</sup> | > 1000                |

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с показателями здоровых лиц

\*\* -  $p < 0,05$  достоверность различий между показателями больных 1 и 2 группы

Изучение фагоцитарной активности нейтрофилов показало, что поглощение бактериальных частиц и переваривающая способность нейтрофилов больных 1 группы в 1,9 раза уступала этому показатель клеток лиц контрольной группы.

Низкая фагоцитарная способность клеток больных ХГВС при сопутствующем ИЗСД наблюдалась и в отношении опсонизированных аутосывороткой бактерий (табл. 6).

Исследование биоцидных систем нейтрофилов показало, что как кислородзависимые так и кислороднезависимые механизмы в гранулоцитах больных ХГВС при сопутствующем ИЗСД существенно подавлены по сравнению с больными ХГВС не страдающих эндокринопатиями и

значительно ниже, чем больных 2 группы и здоровых лиц (табл. 5). Эффективность нейтрофильного внутриклеточного киллинга у больных 1 группы в 3,6 раза, а у больных 2 здоровыми лицами (табл. 7). Активность продукции супероксидных радикалов, изученная в индуцированном НСТ-тесте, была снижена на 20,3%, активность МПО – на 27,7% по сравнению с нормой (табл. 7). Система МПО в азурофильных гранулах нейтрофилов является основным фактором бактерицидности, участвует в образовании гипохлорит-аниона, который играет важную роль в биоцидности клетки. Исследование содержания катионных белков и активности лизоцима показало более их низкое содержание, чем у здоровых лиц и больных ХГВС без ИЗСД (табл. 7).

Таблица 5

**Фагоцитарная и бактерицидная активность нейтрофилов больных ХГВС ( $M \pm \sigma$ )**

| Показатели                                      | Здоровые лица  | Больные ХГВС+ИЗСД  | Больные ХГВС без ИЗСД |
|---|----------------|--------------------|-----------------------|
| ФЧ, %   | 75,6 $\pm$ 7,2 | 56,1 $\pm$ 6,2*    | 64,2 $\pm$ 6,2        |
| ФИ  | 5,7 $\pm$ 0,6  | 3,2 $\pm$ 0,4* **  | 4,4 $\pm$ 0,4*        |
| Процент выживших бактерий после фагоцитоза (ВК) | 5,0 $\pm$ 0,5  | 17,3 $\pm$ 1,8* ** | 8,5 $\pm$ 1,1*        |

\*  $P < 0,05$  по сравнению с показателями здоровых лиц,

\*\*  $P < 0,05$  между показателями больных хроническим синуситом с СД и больных хроническим синуситом без СД

Таблица 6

**Фагоцитарная и бактерицидная активность нейтрофилов больных ХГВС в отношении опсонизированных бактерий ( $M \pm \sigma$ )**

| Показатели                   | Сыворотка здоровых доноров      | Повышение показателя, % | Сыворотка больных синуситом     | Повышение показателя, % |
|------------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| <b>Больные ХГВС+ИЗСД</b>     |                                 |                         |                                 |                         |
| ФЧ, %                        | 64,7 $\pm$ 7,2 <sup>*****</sup> | 115,3                   | 58,8 $\pm$ 6,7 <sup>*****</sup> | 104,8                   |
|                              | 91,5 $\pm$ 8,3*                 | 121                     | 81,9 $\pm$ 6,7                  | 108,3                   |
| ФИ                           | 5,3 $\pm$ 0,6 <sup>*****</sup>  | 165,6                   | 3,2 $\pm$ 0,3 <sup>*****</sup>  | 0                       |
|                              | 9,6 $\pm$ 0,6*                  | 168,4                   | 6,2 $\pm$ 0,6                   | 108,7                   |
| <b>Больные ХГВС без ИЗСД</b> |                                 |                         |                                 |                         |
| ФЧ, %                        | 80,4 $\pm$ 7,9*                 | 125,2                   | 76,9 $\pm$ 7,9*                 | 124,8                   |
|                              | 91,5 $\pm$ 8,3*                 | 121                     | 89,4 $\pm$ 8,3                  | 118,2                   |
| ФИ                           | 7,6 $\pm$ 0,7 <sup>***</sup>    | 172,7                   | 7,10 $\pm$ 0,7 <sup>***</sup>   | 154,3                   |
|                              | 9,6 $\pm$ 0,6*                  | 168,4                   | 8,6 $\pm$ 0,6*                  | 150,8                   |

Примечание:

1. В числителе приведены показатели больных ГВС, в знаменателе – здоровых лиц;

2. Повышение (%) фагоцитоза опсонизированных бактерий по сравнению с неопсонизированными бактериями.

\*  $p < 0,05$  по сравнению с показателями фагоцитоза неопсонизированных бактерий в соответствующей группе обследованных

\*\*  $p < 0,05$  по сравнению с показателями здоровых лиц

\*\*\*  $p < 0,05$  между показателями больных 1 и 2 групп

Таблица 7

#### Показатели микробицидности нейтрофилов больных ХГВС ( $M \pm \sigma$ )

| Показатели            | Здоровые лица    | Больные ХГВС+ИЗСД  | Больные ХГВС без ИЗСД |
|-----------------------|------------------|--------------------|-----------------------|
| Инд НСТ-тест, %       | 28,1 $\pm$ 2,05  | 22,4 $\pm$ 2,01*   | 25,1 $\pm$ 2,2        |
| Инд МПО, 0,01Ед ВМ/мг | 19,2 $\pm$ 3,7   | 13,9 $\pm$ 2,8*    | 15,7 $\pm$ 2,8        |
| КБ, СЦК               | 1,49 $\pm$ 0,08  | 0,91 $\pm$ 0,09*** | 1,21 $\pm$ 0,08       |
| Лизоцим, мкг/мг       | 147,9 $\pm$ 22,6 | 87,6 $\pm$ 15,4*** | 108,7 $\pm$ 16,3      |

\*  $p < 0,05$  по сравнению с показателями здоровых лиц

\*\*  $p < 0,05$  между показателями больных 1 и 2 групп

Полученные данные свидетельствуют о том, что развитие хронического гнойного верхнечелюстного синусита у лиц, страдающих ИЗСД, тесно связано с изменениями активности как гуморального так и фагоцитарного звена иммунитета. У больных хроническим верхнечелюстным синуситом, страдающих ИЗСД, в несколько большей степени, чем у больных ХГВС без ИЗСД угнетена фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов, нарушены процессы захвата и киллинга бактерий. У больных ХГВС при сопутствующем ИЗСД в

#### ВЫВОДЫ

Развитие гнойного верхнечелюстного синусита у лиц при сопутствующем ИЗСД протекает на фоне снижения активности основных противомикробных факторов иммунитета, аффинности продуцируемых антител, опсонизирующих свойств сыворотки, фагоцитарной и биоцидной активности нейтрофилов.

отличие от больных без ИЗСД достоверно снижены опсонизирующие свойства сыворотки и аффинность вырабатываемых антимикробных антител. В свою очередь, снижение иммунореактивности организма способствует хронизации процесса и персистенции инфекции. инфекционные возбудители индуцируют и поддерживают воспаление, затрудняющее формирование полноценной местной иммунной реакции.

Снижение биоцидности нейтрофилов ассоциируется с нарушениями как кислородзависимых, так и кислороднезависимых антимикробных систем.

В дальнейшем является перспективным подбор и изучение эффективности иммунотерапии на состояние антимикробного иммунитета у больных ХГВС при сопутствующем ИЗСД.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонив В.Ф., Кравченко Д.В., Кравченко А.В. и др. // Вестник оториноларингологии. - 1998. - №3. - С. 28-30.
2. Бухарин И.В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. -Томск. - 1974. - 208 с.
3. Заболотный Д.И., Луценко В.И., Розкладка А.И. // Ринология. - 2003. - №2. - С. 26-29.
4. Тельнюк Я.И., Сетдинова Н.Х., Карсонова М.М. // Иммунология. - 2003. - №1. - С. 20-23.
5. Филатова С.В. // Иммунология. - 2001. - №2. - С. 37-42.
6. Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. Иммунологические исследования в клинике. -К.:Здоровье. - 1978. - С. 22-23.
7. Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. Там же. - С. 28.
8. Чиркин В.В., Веников Ю.Ю., Кожевников Г.И. // Иммунология. - 1990. - №3. - С. 75-77.
9. Luxton R.W., Tompson E.J. // J. Immunol. Meth. - 1990. - № 131. - P.277-282.
10. Nielsen S.L., Blak F.T., Storgaard V. et al. // APMIS. - 1995. - № 103. - P.460-468.

## СТАН АНТИМІКРОБНОГО ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ НА ГНІЙНИЙ ВЕРХНЬОЩЕЛЕПНИЙ СИНУСИТ

О.В. Огнівенко<sup>1</sup>, М.М. Попов<sup>1</sup>, О.А. Романова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Україна

<sup>2</sup>Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України», Харків

#### РЕЗЮМЕ

Стан антимікробного імунітету було вивчено у 29 хворих на хронічний гнійний верхньощелепний синусит у фазі загострення при супутньому інсулінозалежному цукровому діабеті (1 група) та 29 хворих на хронічний гнійний верхньощелепний синусит, які не страждають на ендокринопатії (2

група). Розвиток гнійного верхньощелепного синусита у хворих на хронічний гнійний верхньощелепний синусит при супутньому інсулінзалежному цукровому діабеті пліне на тлі зниження активності основних протимікробних факторів імунітету, афінності антитіл, що продукуються, опсонуючих властивостей сироватки, фагоцитарної та біоцидної активності нейтрофілів. Зниження біоцидності нейтрофілів асоціюється з порушеннями як киснезалежних, так і киснезалежних антимікробних механізмів.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** антимікробний імунітет, нейтрофіли

## ANTIMICROBIAL IMMUNITY CONDITION IN PATIENTS WITH PURULENT MAXILLARY SINUSITIS

*E.V. Ognivenko<sup>1</sup>, N.N. Popov<sup>1</sup>, E.A. Romanova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkov National University, Ukraine

<sup>2</sup>State establishment «I.I. Mechnykov Institute of Microbiology and Immunology of the Academy of Medical Science of Ukraine», Kharkiv

---

### SUMMARY

Antimicrobial immunity condition has been examined in 29 patients with purulent maxillary sinusitis in the exacerbation phase under insulin-dependent diabetes mellitus (group 1) and 29 chronic purulent maxillary sinusitis patients not suffering from endocrinopathies of any kind (group 2)/ Development of purulent maxillary sinusitis in persons insulin-dependent diabetes mellitus progresses against the background of the significant decrease of the main antimicrobial immunity factors activity, affinity of the produced antibodies, opsonizing properties of serum, and phagocytic biocidal activity of neutrophils.

Neutrophil biocidity decrease is associated with malfunctions occurring in both oxygen-dependent and oxygen-independent antimicrobial mechanisms.

**KEY WORDS:** antimicrobial immunity, neutrophils